

<p>56352W/34 B02 D16 MICROBIOCH RES FOUN 01.08.73-JA-085884 (04.04.75) Isoflavone cpd. inhibiting catechol-O-methyl transferase - prepd. by culture of <i>Actinomyces roseolus</i> ISP-5174</p>	<p>ZAID 01.08.73 *J5 0035-393</p>	<p>B6-A1, B12-F5, B12-G1. yellow (I) m.pt. 176°, yellow (II) m.pt. 180° and brown (III) m.pt. 215° powders were obtd. at 58.0, 24.0, and 12.5 mg resp. from 4 l filtrate, (IV) was inhibited at 50% by 50, 78, and 5 γ of cpds. (I), (II) and (III), resp. The cpds. also inhibited histidine decarboxylase. The cpds. reduced the blood pressure.</p>	<p>Novel isoflavon cpds. (I), (II) and (III)</p> <div data-bbox="617 1617 812 2016"> </div> <p>(I) (X=H, Y=OMe, Z=OH) (II) (X=OMe, Y=H, Z=OH) (III) (X=OMe, Y=OMe, Z=H)</p> <p>inhibiting catechol-o-methyl transferase (IV) were produced by <i>Actinomyces roseolus</i> ISP 5174. In example the microbe was cultured on a medium (pH 7.4) contg. soybean cake 2, glucose 1, starch 2, NaCl 0.25, CaCO₃ 0.35, CuSO₄ 5H₂O 0.0005, MnCl₂ 4H₂O 0.0005 and ZnSO₄ 7H₂O 0.005% at 27° for 5 days. The cpds. were extd. with BuOAc from the culture filtrate, concd. pptd. with petroleum ether, dissolved in Me₂CO, and fractionated by a silica gel column chromatog. By concn. to dryness of each fraction, pale</p>
---	--	--	--

C



(2000円)

特 許 願

第 1 号

昭和49年8月1日

特許庁長官へ

1. 発明の名称 カテコールオ-メチル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 発明者 住所 東京都練馬区豊玉北4の23

氏名 梅 沢 浜 夫 外4名

3. 特許出願人 住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名称 財団法人微生物化学研究会

代表者 市 川 清 二

一國一語

4. 代理人 住所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号 三井物産館内 電話(591)0261番 2274

(2400) 氏名 金 丸 義 男 外4名

⑬ 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 50-35393

④公開日 昭50.(1975) 4. 4

②特願昭 48-85884

②出願日 昭48.(1973) 8. 1

審査請求 未請求 (全12頁)

庁内整理番号 7048 49

7110 49 6910 44

7048 49

⑤日本分類

36(2)D521

36(2)D914

36(2)C0

16 E41

⑥Int. Cl²

C12D 13/10

A61K 37/04

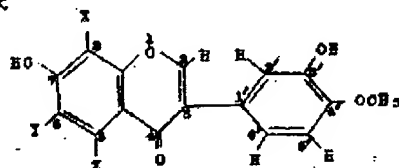
明 細 書

1. 発明の名称

カテコールオ-メチル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

放線菌に属する新規イソフラボン化合物生産菌を好意的に培養してカテコールオ-メチル転移酵素を阻害するイソフラボン化合物を生産せしめ、これを培養物から採取することを特徴とする一般式



X = H, Y = OCH₃, Z = OH (化合物(I))

X = OCH₃, Y = H, Z = OH (化合物(II))

X = OCH₃, Y = OCH₃, Z = H (化合物(III))

を有するカテコールオ-メチル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物(Ⅰ), (Ⅱ), (Ⅲ)の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はカテコールオ-メチル転移酵素(以下COMTと略記する)の強力な阻害剤である5',6,7-トリヒドロキシ-4',6-ジメトキシ-イソフラボン(Ⅰ), 5',6,7-トリヒドロキシ-4',8-ジメトキシ-イソフラボン(Ⅱ)及び5',7-ジヒドロキシ-4',6,8-トリメトキシ-イソフラボン(Ⅲ)の製造法、特に微生物を培養して、その培養物からこれ等の化合物を採取する方法に関するものである。

本発明者等はカテコールアミン類のカテコール骨格のメチル位の水酸基をメチル化するCOMTの阻害物質を系統的に探索し、放線菌の培養液及び菌体内にその阻害物質の存在をみだし、これを分離精製して、化学構造の研究を行い、これ等がイソフラボン骨格を持つ事を見出しさらに化学的・物理的・生物学的にこれ等以上記(Ⅰ), (Ⅱ), (Ⅲ)の化学構

造を有する新規化合物である事を明らかにすると共に、微生物を培養して、培養物からこれ等の化合物を採取する方法を説明した。

本発明以前には天然物中にも化学合成物中にも化合物(I)、(II)、(III)は報告されていない。實がつて(I)、(II)、(III)の化合物を採取したのは本発明者等が最初である。

本発明以前には0027の阻害剤は外部より注入されたアドレナリン、ノルアドレナリン等の消失速度を遅らせ、アドレナリン、ノルアドレナリンによる血圧上昇作用の延長及び増強作用を有する事が報告され、又この阻害剤には内在のカテコールアミン類の減少によつて起るとされているうつ病などの病気の治療剤となる可能性が考えられる。さらに分枝病の原因は替わいわれているがその一つに生体アミンの異常メチル化合物(カテコールアミン、セロトニンのメチル化合物)が体内で発生することが原因であると云う仮説があり、特に分枝病等における幻覚症状の発現はカテコールアミン類の異常メチル化合物によつて起ると言われている。

の事により化合物(I)、(II)、(III)は高血圧症及び動脈硬化症などの病気の治療剤としての可能性及びパーキンソン症候群のドーパミンの治療に際しての阻害剤となり得る可能性などが期待される。さらに化合物(I)、(II)がヒスタジン脱炭酸酵素を阻害する事を発見したがこの事は人の表皮及びアレルギー症の治療剤としての可能性も考えられる。

本発明以前には前記インフラモン類(I)、(II)、(III)は天然物のなかには存在する事が知られていなかったが本発明者等は数種の菌類菌株IOP 5174であるアクチノミセス・ロゼオルス(*Actinomyces roseolus*) ; 文献 R.B. Shirling 等, International Journal of Systematic Bacteriology, 18巻, 167頁, 1968年; O.P. Gause, Zur Klassifizierung der Actinomyceten, 28頁, 1958年 (Verlag Gustav Fischer Verlag, Jena) を培養して、培養物から前記化合物(I)、(II)、(III)を数多く採取する方法を説明した。2か、本開示を昭和48年2月24日、工業技術院微生物工業技術研究所に保管

(文献: R.E. Hinrich, G.S. Kety, J.R. Smythies, Amine and Schizophrenia, 1967年, Pergamon Press, Oxford)。そこでCOMTの阻害剤は分枝病及びその幻覚症状の治療剤としての可能性が考えられる。またインフラモン類の抗凝血作用が村田、池田等によつて報告され (Agr. Biol. Chem., vol 32, No. 740~746, 1968)、さらにコレステロールの蓄を防ぐ事がモールス、モロー、ムーアリス等(O.W. Moersch, D.W. Morrow, W.A. Newkiss; J. Med. Chem., 10(2), 154~158, 1967)によつて報告されている。また本発明者等はデビリス、アワバ等(Y.E. Davis, J. Awapara; J. Biol. Chem., 233, 124~127, 1960)のドーパミン脱炭酸酵素の活性の測定法を用いて化合物(I)、(II)、(III)のこの酵素に対する阻害度を測定し、化合物(I)、(II)が強く本酵素を阻害し、化合物(III)は阻害を示さない事を発見した。又化合物(I)、(II)、(III)を高血圧自然動脈ラットに投与した時、その血圧を低下させる事を発見した。これ等

を既申請し、微生物菌種番号は1006号である。

本発明により、化合物(I)、(II)、(III)はそれを生産する菌株を通常の微生物の培養法として公知の方法で培養して培養物中に生産せしめられる。例えば化合物(I)、(II)、(III)の生産菌アクチノミセス・ロゼオルスは、グリセリン・アムペラゼン琼脂培地、卵黄芽菜天竺地等の公知の培地に継代培養され、化合物(I)、(II)、(III)の生産のためにこれ等の琼脂培地上の発育菌糸を区別生産培地に接種して培養できる。また放線菌株に培養せしめられた菌体を菌液として生産培地に接種して培養し生産せしめる事ができる。

アクチノミセス・ロゼオルスは25°~35°Cで発育するがこれ等の化合物の生産には25°~30°Cが好ましい。

アクチノミセス・ロゼオルスを培養して化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるためには、カビ、不完全菌、放線菌、細菌などの微生物の培養に公知の栄養源はすべて利用できる。例えばグルコース、

マルトース、ラクトース、サツカロース、グリセリン、デキストリン、澱粉、大豆粕、酵母等を培養液として利用できる。大豆粕 2.0 重量部、酵母エキス 0.5 重量部、 NaOH 0.2 重量部、 CaCO_3 0.3 重量部、

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 重量部、 $\text{MnO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 重量部、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 重量部を含む培地を基礎培地として、上記の培養液を下記の割合になる様に添加した培地 12.8 重量部を 500.00 重量部の坂口フラスコに分注して、180℃で 30 分間、加圧殺菌し、これにグリセリン・アズペラギン寒天斜面培地に 2.7 重量部で 14 日間培養した菌糸を一日食耳接種し、2.7 重量部で振盪培養したとき、培養 5 日目の COMT の阻害率は下記の様であつた。

培養液の割合と濃度	pH	培養液	COMT 阻害率
マルトース 2.5%	7.2	× 2	25%
ラクトース 1%	7.2	○	55%
サツカロース 2.5%	7.2	○	30%
デキストリン 1%	7.5	○	35%
サツカロース 1%	7.8	○	35%

培養液の割合と濃度	pH	培養液	COMT 阻害率
グリセリン 2.5%	8.0	× 2	55%
デキストリン 2.5%	7.8	○	50%
ラクトース 2.5%	7.5	○	50%
デキストリン 2.5%	7.3	○	50%
糖 2.5%	7.0	○	50%

上記の様に何れの培養液もこれらの化合物の生産に利用できるが特にグルコース、酵母が好適な培養液である。

化合物 (I)、即ち、菌の生産のために放線菌、カビ、不完全菌、細菌その他の微生物の培養のために用いられる培養液はすべて利用できる。例えばペプトン・肉エキス、酵母エキス、大豆粕、大豆粕・コーンスティープリカー、カザミノ酸、酵母等が利用できる。上記の様にグルコース 2 重量部、澱粉 2 重量部、 NaOH 0.2 重量部、 CaCO_3 0.3 重量部、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 重量部、 $\text{MnO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 重量部、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 重量部を含む培地を、下記の濃度になる様に培養液を添加して殺菌し、これに前記の寒天斜面培地に培養せしめた菌糸を接種して 5 日間振盪培養したとき、COMT の阻害率を表記すると次の如くであつた。

培養液の割合と濃度	pH	培養液	COMT 阻害率
大豆粕 2.0%	7.6	× 2	58.0%
コーンスティープリカー 0.5%	7.6	○	45.0%
酵母 2.0%	7.6	○	51.0%
肉エキス 0.5%	7.8	○	50.0%
カザミノ酸 0.5%	7.6	○	50.0%
酵母 2.0%	7.6	○	50.0%

培養液の割合と濃度	pH	培養液	COMT 阻害率
肉エキス 0.75%	7.8	× 2	18.0%
ペプトン 0.5%	7.8	○	65.0%
大豆粕 2.0%	7.5	○	45.0%
大豆粕 (7.5%)	7.3	○	45.0%
大豆粕 (2.5%)	7.3	○	45.0%
大豆粕 2.0%	7.3	○	60.0%

化合物①、②、③を生得せしめるために必要とするならば無機塩、金属塩、重金属塩の微量を加える。又地熱発酵中、培養中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物①、②、③は生産菌アタチノミセス・ロゼオルスを好氣的に培養して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる通気攪拌タンク培養法がそのまゝ本発明に用いられる。また化合物④、⑤、⑥の培養液中での濃度は以上に述べた培養での諸条件によつて異なる事は専門家に於ては公知の事実である。したがつて菌株の改良、培養条件の選択によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家に於ては容易な事である。この発明はそれ等のすべての修飾方法をも包括するものである。

昭 智 恵 を 求 め る。

また化合物(1), (2), 及び(3)はヒスタジン脱炭酸酵素も阻害するが、その阻害活性は次の方法で測定される。すなわち反応組成は1-ヒスタジンを 2×10^{-4} M (2.0×10^6 cpm) の 2.6×10^{-4} M, トリドキサール核酸 (3.4×10^{-5} M), ヒスタジン脱炭酸酵素 (蛋白質 2 mg/ml) 0.1 ml, 0.2 M モル磷酸緩衝液 (pH 6.8) 0.1 ml, 試料溶液を加えて蒸留水で全容を 2 ml とする。この反応液を 37°C、5 時間反応後、生成するヒスタジンを 2×10^{-4} M をアンバーライト CG-50 のアミノ酸型に吸着させ、水洗後 1 規定アミノ酸水で洗脱したヒスタミンを抽出させ、抽出液を一定量取り放射能活性を液体シンチレーションカウンタで測定し、生成したヒスタミン量を測定してその阻害率を求める。

次に化合物①、②、③の抽出液について記述する。これ等の化合物はアルコール性の水、メタノール、エタノール、アセトン等の溶媒に溶け、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等には僅かに溶

解する。これ等の化合物は培養液内から酸性でブタノール、酢酸ブチル等に抽出され、固体固形物からはメタノール、アセトン等で抽出される。この固体固形物からの抽出液は減圧蒸留によつて濃縮され、濃縮液は酸性に調整後酢酸ブチル、ブタノール等によつて抽出され、培養液内から抽出された酢酸ブチル、ブタノール等の溶液と混合して減圧濃縮範囲する。

上記の操法にして得た抽出範囲物質は石炭エーテル、ノルマルヘキサン等で処理すると(1)、(2)、(3)の化合物は共に不溶部に移行する。さらにこの不溶部をアセトンで抽出すると蒸餾層に活性部が移行し、残物は不溶部として残れる。このアセトン抽出液を減圧蒸餾範囲し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、ベンゼン：アセトン(20:1)で抽出すると活性の強い三個のフラクションに分離される。さらに各々の活性部の活性物質はセフアダンタスLH-80を用いたカラムクロマトグラフィー、アルミナを用いたカラムクロマトグラフィー、必要を時はシリカゲルの再タ

ロマトグラフィーによつて精製され、最初の活性フラクションからは化合物①、2番目からは化合物②、最後のフラクションからは化合物③が各々結晶として単離される。

これ等の化合物の遊化学的性質は下記の表1のごとくであり、さらに詳細な化学構造の研究の結果、化合物①はγ,δ,7-トリヒドロキシ-4',8'-ジメトキシ-イソフラボン、化合物②はγ,δ,7-トリヒドロキシ-4',8'-ジメトキシ-イソフラボン、化合物③はγ,7-ジヒドロキシ-4',8'-トリメトキシ-イソフラボンであると本発明者等は決定した。

表 1

遊化学的性質	I	II	III
性状 (融点)	無色針状 (170°)	無色針状 (180°)	無色針状 (190°)
元素分析例 (%)	C:61.02, H:4.31, O:33.29	C:61.63, H:4.50, O:34.31	C:62.66, H:4.79, O:32.35
マスマスペクトル	550	520	544
分子式 (分子量) と 融点値	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (330.28) C:61.02, H:4.27, O:33.91	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (330.28) C:61.62, H:4.27, O:33.91	C ₁₈ H ₁₆ O ₆ (344.32) C:62.97, H:4.60, O:32.63
酸化還元反応	① 無色	② 無色	③
ギンブスの反応	無色	黄褐色	黄褐色
-OCH ₃ の数 (NMRから)	3	2	3
アセチル基の導入数 (NMRから)	5	5	2
紫外吸収係数 (log ε) ① エタノール ② エタノール (過酸化) ③ MeOH 溶液 (エタノール)	1) 280.0nm (log ε: 4.505), 205nm (log ε: 4.302), — 2) 280.0nm (log ε: 4.507), 240nm (log ε: 4.302), 205nm (log ε: 4.302)	1) 280.0nm (log ε: 4.318), 205nm (log ε: 4.302) 2) 280.0nm (log ε: 4.302) 3) 279.0nm (log ε: 4.310)	1) 280.0nm (log ε: 4.314), 205nm (log ε: 4.302) 2) 280.0nm (log ε: 4.314), 205nm (log ε: 4.302) 3) 280.0nm (log ε: 4.302), —
紫外吸収スペクトル (nm ⁻¹)	5600 1650 1630 1600 1520 1470 1380 1300 1240 1180 1170 1130 1070 1030 1000 940 900 870 820 810 780 730 670	5400 1650 1620 1590 1510 1430 1370 1320 1270 1180 1170 1130 1060 1030 990 940 900 880 820 810 750 720 670	5500 1650 1610 1580 1510 1470 1380 1320 1260 1180 1120 1090 1030 1000 960 900 860 820 800 800 780 740 700 670 710
NMR (DMF-d ₂) 100MHz (ppm)	18.20(OH):s 10.74(OH):m 9.03(OH):m 8.53(H):s 7.05(H):s 6.97(H):s 6.84(H):s 4.78(H):s 4.82(H):s	12.65(OH):s 10.78(OH):m 9.04(OH):m 8.46(H):s 7.06(H):s 6.97(H):s 6.53(H):s 5.79(H):s 5.81(H):s	10.00(OH):m 9.00(OH):m 8.22(H):s 7.07(H):s 6.98(H):s 5.90(H):s 5.85(H):s 5.81(H):s
溶解度 (mg/ml)	1) 0.80 2) 0.80 3) 0.65	1) 0.28 2) 0.31 3) 0.60	1) 0.10 2) 0.31 3) 0.80

次に化合物(I)、(II)、(III)の生物学的性状について記述する。化合物(I)、(II)、(III)の毒性は20mg/mlチルスルホキサイド水懸液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したとき300mg/kgで毒性を示さなかつた。

前述の測定法でCOMT活性の50%阻害の濃度を求めると化合物(I)は0.5γ/α (3.515×10^{-4} モル)、化合物(II)は5.0γ/α (1.515×10^{-4} モル)、化合物(III)は0.2γ/α (5.80×10^{-4} モル)であつた。なおこれ等の物質は本発明者等が記載した方法でチロシン水酸化酵素(7. Antibiotics, 21, 350, 1968)及びドーパミン水酸化酵素(7. Antibiotics, 21, 354, 1968)の阻害活性を測定したが100γ/αでそれ等の酵素の阻害作用は認められなかつた。さらに初記の方法でドーパミン水酸化酵素の阻害を調べると化合物(I)は12.0γ/α (3.79×10^{-4} モル)、化合物(II)は5.0γ/α (1.515×10^{-4} モル)で50%の阻害率を示したが化合物(III)は100γ/αで阻害を示さなかつた。又前述の制

薬法でヒスタジン脱炭酸酵素の阻害を調べると化合物(I)は5.0γ/α (1.5×10^{-4} モル)、化合物(II)は1.5γ/α (4.5×10^{-4} モル)で50%の阻害率を示したが、化合物(III)は10.0γ/αの濃度で約51.9%の弱い阻害率を示した。上記のように化合物(II)は他の酵素の阻害活性を示さずCOMTのみに阻害活性を示す極めて特異的な化合物である。

化合物(I)、(II)、(III)は100γ/αで細菌類、カビ類に対して発育阻止作用を示さなかつた。

又化合物(I)、(II)、(III)を高血圧自然発症ラットの腹腔内に投与し、その血圧降下作用を調べた結果の1例を示すと化合物(I)では50mg/kgの投与で1時間後20.0%、5時間後18.4%、6時間後38.0%、24時間後5.8%、12.5mg/kgの投与で1時間後13.8%、5時間後10.9%、6時間後18.8%、24時間後7.8%の血圧降下作用を示した。化合物(II)は50mg/kgの投与で1時間後22.3%、5時間後30.9%、6時間後35.3%、24時間後23.9%、4.8時間後

16.3%、12.5mg/kgの投与で1時間後18.4%、5時間後34.4%、6時間後22.8%、24時間後18.0%、4.8時間後18.0%、5.1mg/kgの投与で1時間後21.0%、3時間後26.3%、6時間後29.0%、24時間後22.0%、4.8時間後13.4%の血圧降下作用を示した。化合物(III)では50mg/kgの投与で1時間後13.9%、5時間後13.0%、6時間後17.3%、24時間後7.0%、4.8時間後、2.8%の弱い血圧降下作用を示した。

以下、本発明によるインフラゲン類の新規化合物(I)、(II)、(III)の製造法の実施例を示すが、本発明により化合物(I)、(II)、(III)が微生物で造られる事が明らかにされたのでこの明細書に記載された知見に基づいて、本明細書に記載された方法を修飾した方法が容易に設定される。本発明者等が微生物が造る酵素阻害物質の系統的研究で示した様に、酵素阻害物質の生産は特定の菌種に限らない。かくして本発明で放線菌の一種による化合物(I)、(II)、(III)の生産が明らかにされたので放線菌の他の菌種を

用いて生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。

本発明はそのすべての修飾方法をも包括し、実施例はその例示で、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 2

化合物(I)、(II)、(III)を生産する放線菌アグチノミセス・ロゼオリスをグリセリン・アムブラゲン寒天斜至培地に24日培養させ、その菌液から一白金耳量、大豆粕2%、グルコース1%、酵母粉2%、 NaCl 0.25%、 CaCO_3 0.55%、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{MnCO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%を含む培地を殺菌前pH7.4に修正して、125℃、20.500℃の坂口コルペンに分注し、120℃、20.0分間殺菌した培地に接種し、27℃で毎分130往復の振盪で8日培養した。pHは培養前7.0、2日後6.8、3日後6.4、4日後6.8、5日後7.2であつた。培養中の残糖はベルトラン法で還元糖を分析すると、2日後で

2.85g、3日後で1.00g、4日後で0.85g、5日後で0.25gであつた。この増殖数50000を伊達して伊達40000を得た。この伊達の00MT阻害活性は5倍に希釈して44%の阻害率を示した。この40000の伊達を2M-HClでpH 2.0に修正し40000の酢酸ブチルで抽出し(収率80%)、抽出液を外温60°Cで減圧濃縮乾燥すると18.5gの赤褐色のシラップ状物質が得られ、さらに石油エーテル2000ccで処理すると9.5gの石油エーテル不溶部が得られ、この00MTの阻害活性は250%で80%の阻害率を示し、石油エーテル可溶部はほとんど阻害率を示さなかつた。得られた石油エーテル不溶部をアセトン100ccに溶解させて不溶部を除き、30%のマリンダロフト社製のシリカゲル(AR-100~200メッシュ)をアセトン溶液中に加えて減圧濃縮乾燥させ、ベンゼン:アセトン(10:1)の溶媒系でシリカゲル(前記マリンダロフト社製)500gをゲル化させる×90ccのカラムに充填したカラムを用いて、

ヤーファーマンター(4%分)の培養液4.5mlをバスケット型の遠心分離機で毎分2600回転で遠心分離を行い、伊達4.0ml、懸体固形部8%が得られ、懸体固形部は5%のメタノールで抽出するとメタノール溶液4.8mlが得られた(伊達は1.5で60%、メタノール抽出液は1.5で80%の00MTの阻害率)。メタノール抽出液を800ccまで減圧濃縮し、伊達と合せて4M-HClでpH 2.0とし実施例1と同様の比率で酢酸ブチル抽出を行い、抽出液を減圧濃縮乾燥すると80.0gの油状物質が得られ、さらに石油エーテル4.0mlで処理すると石油エーテル不溶部は88.0gの褐色の粉末が得られ、この粉末の活性は全体の85%であつた。この粉末を実施例1で示した方法の3倍の比率で、実施例1と同様にカラムクロマトグラフィーを行い最初の活性部からは790mgの黄色粉末、2番目からは280mgの黄色粉末、3番目からは180mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の00MTの80%阻害量は各々20%, 80%, 20%であつた。

特開 昭50-35393 (C)

その上端に乾燥物を施置させ、前記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行うと活性部が3個のフラクションに別れて抽出され、最初のフラクション750ccを濃縮乾燥すると淡黄色の粉末88.0mgが、2番目のフラクション2000ccからは黄色の粉末84.0mgが、最後のフラクション1500ccからは18.5mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の阻害阻害活性は各々80%, 40%, 5%で80%の阻害率を示した。

実施例 2

実施例1と同様な方法で増殖を調整し、同様の方法で培養培養を行い、培養5日目の培養数50000を、実施例1と同組成の培養を80%容のジャーファーマンターに3.5%充填込み、120°C、50分間高熱蒸気中で殺菌し、シリコン樹脂を約1.5cc添加して消泡し、ジャーファーマンター2番目につき接種する。34°Cで300時間、培養空気を毎分1.2%通気し、毎分250回転の攪拌機で攪拌しながら、発泡した時はシリコン樹脂を加えながら培養を観けた。この様にして得たジ

さらに最初の活性部をメタノール100ccに溶解させセファグクサスLB-20(5000cc)のカラムクロマトグラフィー、メタノール抽出法で活性部は3つのピークと成り1800ccにまとまって抽出された。この活性フラクションを減圧濃縮乾燥後、アセトン5ccに溶解させた後ノルマルヘキサン80ccを加えて一夜室温に放置すると化合物1の淡黄色針状結晶が18.5mg得られ、さらに再結晶化で18.0mgの純粋な化合物(1)が得られた。2番目の活性部も同様にセファグクサスLB-20のクロマトグラフィーで不純物を除き、さらに4ccのベンゼンを加えて60°Cに加熱して溶解させ一夜室温に放置すると280mgの黄色の粗結晶が得られ、同様な方法で再結晶化を行い18.5mgの化合物(2)の淡黄色針状結晶が得られた。

3番目の活性部は重量の3倍量のアルミナ(ダウエル社・中粒化アルミナ)をメタノールでカラムに充填し、メタノールで溶解させた活性部を通過させると色素だけがアルミナに吸着され褐色と成る。この通過液をセファグクサスLB-20

のクロマトグラフィーを行い1番目の活性成分と同様に処理すると11.3分の化合物の無色針状結晶が得られた。

実施例 8

メタによる培養は実施例1と同様にして培養した種母を第1次種母とし、実施例8と同様にして培養した種母を第2次種母として、250ml容のステンレス・スティール製のメタに、実施例1、2と同様な培養を250ml容仕込み120℃で50分間、高純度窒素で殺菌し、シリコン樹脂を0.01%添加後、第2次種母を5%接種し、毎分120mlの殺菌空気を供給し、毎分200回転で攪拌し、37℃で96時間培養した。

この培養液(メタと水分)250mlをフィルター・プレスでろ過し、ろ液200ml、蒸体固形部4.0gを得た。蒸体固形部は80%のメタノールで抽出し、メタノール抽出液70mlを得た。ろ液は3倍に希釈して80%の飽和率を示し、メタノール抽出液は4倍に希釈して80%の飽和率を示した。これらのろ液及びメタノール抽出液は興

隆例2と同様の比率で両様に抽出精製、結晶化を行い化合物(1)の結晶335号、化合物(2)の結晶180号、化合物(3)の結晶78号を得た。

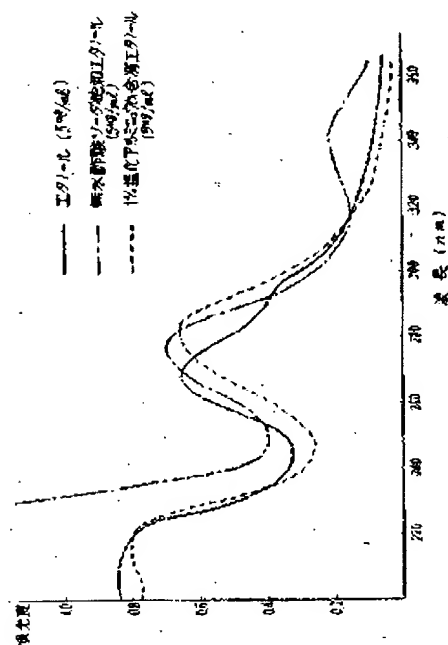
4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第3図は化合物(1)、(2)、(3)のIR/IRの純エタノール溶液、無水酢酸ソーダ相エタノール溶液、2,4-ジニトロフェニルアミン含有エタノール溶液中での紫外吸収スペクトルを示す。

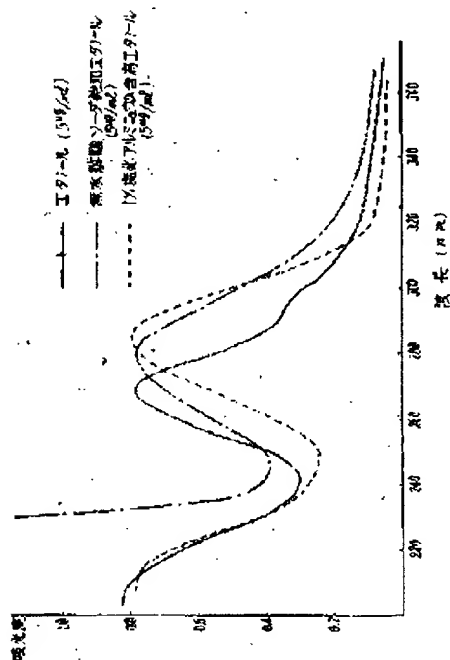
第4図、第5図、第6図は化合物(1)、(2)、(3)を具化カリウムとして測定した紫外吸収スペクトルを示す。

代理人	金	丸	廣	男
同	順	内	忠	夫
同	八	木	田	茂
同	浜	野	孝	雄
同	兼	田	哲	二

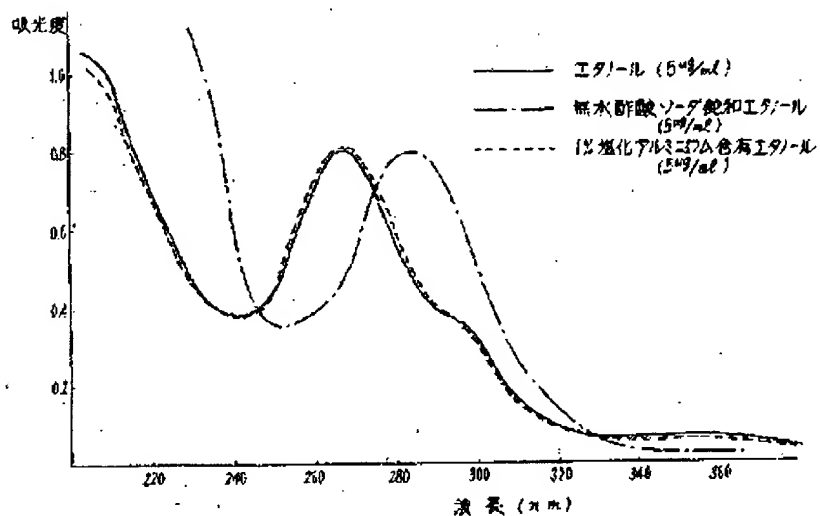
第1図



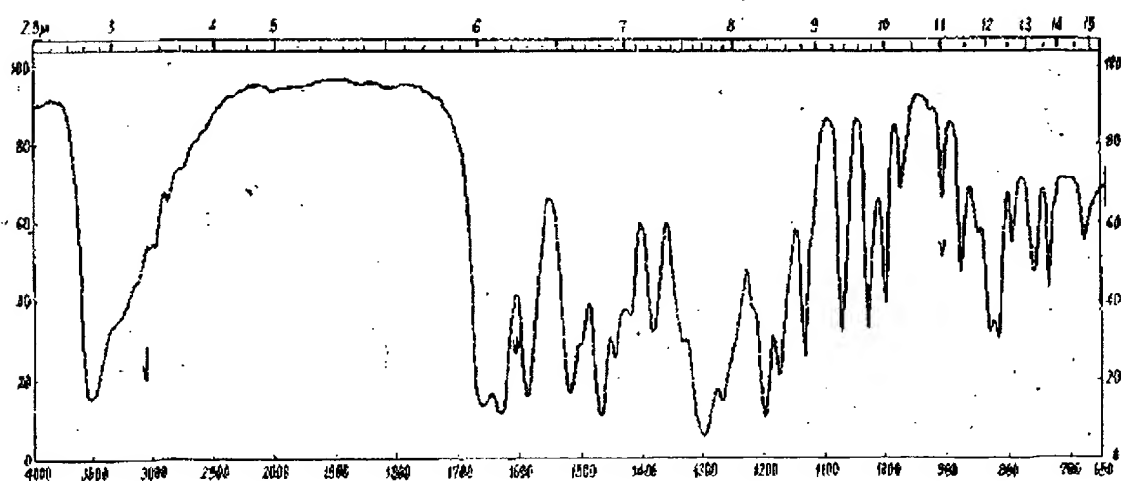
第2図



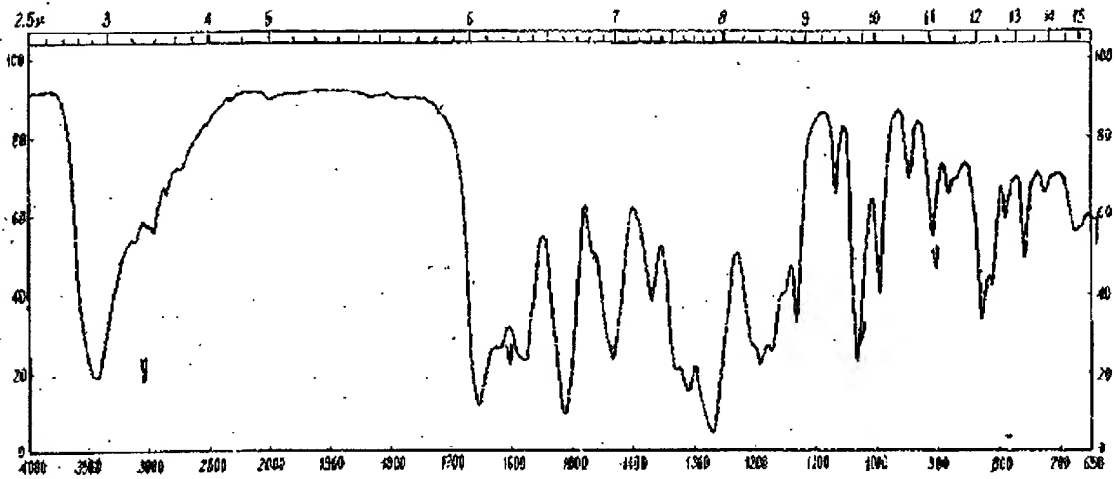
第3図



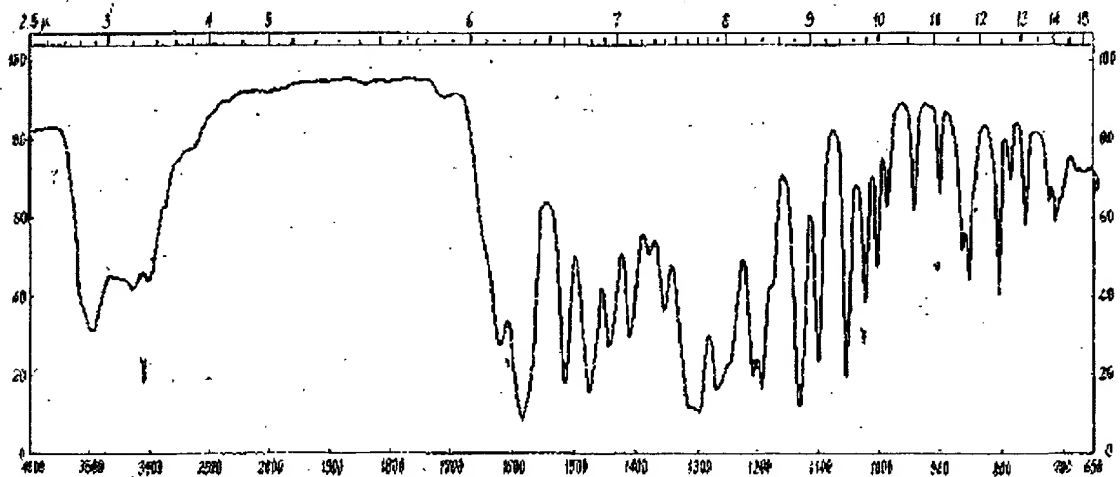
第4図



第5図



第6図



5. 添附書類の目録

- (1) 明細書 1通
(2) 図面 1通
(3) 委任状 1通
(4) 微生物受託番号通知書 1通

6. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
ニム・フクマンション701-A

氏名 竹内 富雄

住所 東京都北区志茂3の17の1

氏名 幸村 義夫

住所 神奈川県高尾郡機橋町吉岡1626-51

氏名 沢 方

住所 東京都保谷南富士町1丁目7番3号の4

氏名 沢 田 雄

特許 昭50-35393 (11)

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産館内

氏名 朝内 忠夫

住所 八木田 茂

住所 浜野 孝雄

住所 森田 哲二

23(11)

手続補正書 (自発)

昭和 48 年 11 月 12 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 48 年 特 許 願 第 83884 号

2. 発明の名称

カテコールオーメタル転写膜の阻害作用を有する
新規インフラボン化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

事件との関係 発明者本人

住所 東京都品川区上大崎3丁目2番23号

財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産館内

(2400) 氏名 金丸 義典

補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

補正の内容

(1) 明細書第4頁第2行「コレステロールの増
を」を「コレステロールの沈着を」と修正す
る。

(2) 同 第4頁第1行「微生物受託番号は第
1906号」を「微生物受託番号は微生物受託
第1906号」と補正する。

(3) 同 第4頁第2行「NaC4」を「NaC6」と
補正する。

(4) 同 第12頁第1行「COMT」を「COMT」
と補正する。

(5) 同 第14頁第1中化合物Iの欄の上か
ら7列目「紫外線吸収」の欄の

「1) 267.0 nm ($\epsilon_{\text{log}}^{\text{g}}: 4.303$), 295 nm
(3)

2) 287.0 nm ($\epsilon_{\text{log}}^{\text{g}}: 4.301$), -

3) 298.0 nm ($\epsilon_{\text{log}}^{\text{g}}: 4.309$), 340 nm
(3)」を

「1) 267.0 nm ($\epsilon_{\text{log}}^{\text{g}}: 4.303$) 295 nm (3)

- 2) 289.0 nm ($\log \epsilon: 4.301$)
 3) 272.0 nm ($\log \epsilon: 4.307$) 390 nm (4)

と修正し、次の

「紫外吸収スペクトル」の列の第1行目・番目の「1383」を「1380」と修正し、次の「NMA (DMSO-d₆)」の列の下から2行目「OCH₃」を「OCH₃」と修正する。更に

表1中化合物Eの欄の上から、列目「紫外線吸収」の列の3)の行の右端の「-」を削除し、次の「紫外吸収スペクトル」の列の最下空行の「242」の次に「259」を加える。

- (6) 同 第17頁第9行「 $0.97/00$ (1.515 X)」を「 $0.97/00$ (1.11 X)」と修正し
 (7) 同 同 第8~9行「 $3.07/00$ (1.513 X 10^{-2} セル)」を「 $2.07/00$ (1.00 X 10^{-2} セル)」と修正する。
 (8) 同 第18頁第6行「上記のよう様」を「上記のよう様」と修正する。

- (9) 同 同 下から第4行「7.2%」を「7.7%」と修正する。

- (10) 同 第20頁第3行「である。」を「である。」と修正する。

- (11) 同 第24頁第4行「1800」を「1800」と修正する。